

論文内容の要旨

論文提出者	戸田 雅子
論文題目	Osteogenic potential for replacing cells in rat cranial defects implanted with a DNA/protamine complex paste
(論文内容の要旨)	
<p>研究目的</p> <p>これまでの研究により、サケ白子由来DNA/プロタミン（以下、DP複合体）は、骨伝導性を有する新規骨補填材料としての有効性が、示唆されてきた。しかし、その詳細な機能については、不明である。そこで、本研究では、ラット頭蓋骨埋入実験後、欠損部を置換する結合組織の構成細胞の性状解析を行い、骨欠損に対するDP複合体の骨形成促進メカニズムを明らかにすることを目的とした。</p> <p>材料および方法</p> <p>10週齢のSDラットの頭蓋骨に全身麻酔下にて直径8mmの骨欠損部を作製し、DP複合体ディスク（内径8mm、厚さ1mm）を埋入した(DP群)。また、材料を埋入しないBlank群をコントロールとした。</p> <p>1) 新生骨形成の評価(<i>in vivo</i>) : 術後1, 2, 3か月において、μCT、組織学的解析(HE染色、Villanueva's Bone染色)を用いて、欠損部新生骨をDP群とBlank群とで比較した。また、DP埋入約2週後の欠損部結合組織を用いて、骨形成関連遺伝子の発現量をReal-time PCRにて解析し、埋入後約1ヶ月の頭蓋骨組織を抗Runx-2抗体にて免疫染色を行った。</p> <p>2) 骨分化誘導能の評価(<i>in vitro</i>) : DP埋入約2週後の欠損部結合組織から採取した細胞をDP細胞、正常な骨膜組織から採取した細胞をP0細胞とし、順目的に培養を行った。これらの細胞を用いて、Real-time PCRでの骨形成関連遺伝子の発現および細胞免疫染色におけるRunx-2の発現を検討した。また、ELISA法によるALP活性の定量解析とALP染色、Alizarin染色を行った。</p> <p>結果</p> <p><i>in vivo</i>において、DP群の欠損部は、厚みのある結合組織で置換され、同組織は骨膜組織と比較して、ALP遺伝子の発現が明らかに亢進していた。Runx-2の免疫染色においては、多数の陽性細胞を確認した。μCT、組織学的解析の結果より、Blank群と比較したDP群の欠損部新生骨形成は、1, 2, 3か月全ての期間で有意に高かった。<i>in vitro</i>において、術後約2週のBlank群における欠損部組織から、細胞の回収はできなかったが、DP群の結合組織からの細胞の回収は、骨膜と同様に行うことができた。通常培地のDP細胞は、P0細胞との比較において、ALP活性では明らかな違いを示さず、Alizarin染色においても、両細胞とも陰性であった。しかし、骨化誘導培地におけるDP細胞は、P0細胞と比較して、骨形成関連遺伝子発現量の増加を認め、Runx-2発現の核内移行が確認された。さらに、ALP活性の上昇やAlizarin染色に陽性の基質を確認した。</p> <p>考察</p> <p><i>in vivo</i>の結果より、骨欠損部にDP複合体を埋入すると、欠損部では早期に結合組織が形成され、これが新生骨形成促進効果に影響を与えていると考えられた。さらに、<i>in vitro</i>の結果から、骨化誘導培地におけるDP細胞は、P0細胞と比較して、より骨芽細胞への分化が誘導されることがわかった。従って、DP複合体には、骨欠損部において、骨芽細胞様細胞に分化する骨原生細胞を多く含有できる結合組織を早期に形成し、新生骨形成を誘導することが示唆された。すなわち、DP複合体は、間葉系幹細胞や前骨芽細胞などの骨芽細胞に分化する細胞が定着しやすい環境を提供する材料であることが示された。</p> <p>結論</p> <p>骨伝導性スキャフォールドとしてのDP複合体の可能性が示された。</p>	